Münster 1936 No 107 Med DiSS

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster - Westf.

Über den Einfluß der Monobromessigsäure auf die Gerinnung der Milch

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster / Westf.

vorgelegt von

Bernhard Hakenkamp

aus Lichtendorf / Schwerte

1935

Gedruckt in der Buchdruckerei Franz Grube, Werne a. d. Lippe

Dekan: Prof. Dr. Klinge

Referent: Prof. Dr. Freund

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Westf.)

Ueber den Einfluß der Monobromessigsäure auf die Gerinnung der Milch.

Die in jeder Milch vorhandenen Milchsäurebakterien veranlassen nach einem Tage oder bei höherer Temperatur schon früher eine Säuerung und Gerinnung der Milch. Die Milchsäurebakterien spalten den Milchzucker in Milchsäure z. T. auch in Kohlensäure und geringen Mengen von wahrscheinlich alkohol- und aldehydartigen Körpern. Zu den milchzuckerzerstörenden Bakterien gehören auch noch andere, z. B. Bakterium Coli.

Seit den Arbeiten von Schwartz und Oschmann[1]), Lundsgard[2]) ist die Wirkung der halogenierten Essigsäure in einer Hemmung der Milchsäurebildung sichergestellt. Die Hemmungswirkung der Monobromessigsäure ist von Haarmann[3]) im hiesigen Institut genau untersucht worden, der an Gewebsbrei unter anaeroben Bedingungen arbeitete. Im Anschluß an diese Versuche hat Rosenfeld[4]) nachgewiesen, daß auch anaerob lebende Eingeweidewürmer unter der Wirkung von Monobromacetat weitgehend die Fähigkeit verlieren, Zucker abzubauen. Die Hemmung der Hefegärung durch halogenierte Essigsäure wurde von v. Euler[5]) festgestellt. In Versuchen aus dem hiesigen Institut hat Gievekemeyer[6]) zeigen können, daß die unter anaeroben Bedingungen eintretende Milchsäurebildung durch Bakterien in gleicher Weise durch Monobromacetat gehemmt wird. Zugleich bedeutet diese Ausschaltung des unter anaeroben Bedingungen wichtigsten Stoffwechselvorgangs eine starke Hemmung des Bakterienwachstums bzw. sogar eine Abtötung.

---

[1]) Schwartz u. Oschmann: C. r. d. soc. biol. 91, 275, 1924; 92, 165, 1925.
[2]) Lundsgaard: Biochem. Z. 220, 1, 8, 1930; 227, 1, 1930.
[3]) Haarmann: ebenda 256, 326, 1932.
[4]) Rosenfeld: Inaugural-Dissertation, Münster, 1934.
[5]) V. Euler, Nilsson u. Zeile: Zeitschr. f. physiolog. Chemie 194, 53, 1931.
[6]) Gievekemeyer: Inaugural-Dissertation, Münster, 1935.

Nach diesen vorliegenden Ergebnissen lag der Versuch nahe, durch Monobromacetatzusatz die Säurebildung und damit die Gerinnung der Milch zu beeinflussen. Neben der Unterdrückung des Zuckerabbaus zu Milchsäure war auch damit zu rechnen, daß die Vermehrung der Milchsäurebakterien dadurch gehemmt werden würde. Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Wirkung von Monobromacetat in verschiedenen Konzentrationen auf das Sauerwerden der Milch zu untersuchen. Es wurde dabei die Gesamtacidität, die Milchsäuremenge und die Abnahme des Zuckers bestimmt.

Die Versuchsanordnung war folgende: Es wurden zu Beginn des Versuchs die Werte für Gesamtacidität, Milchsäure und Laktose bestimmt (= direkter Versuch). Sodann wurde zur Kontrolle eine Probe stehen gelassen und gleichzeitig mit den Versuchsansätzen analysiert (= Kontrolle). Bei der eigentlichen Versuchsreihe wurden Verdünnungen von Monobromacetat zwischen 10^{-7} und 10^{-3} mit Milch angesetzt. Die ganze Versuchsreihe stand bei Zimmertemperatur verschieden lange (die Versuche wurden im Juni und Juli bei großer Hitze durchgeführt). Da die Säurewerte und die Milchsäuremenge nicht parallel gingen, wurde in den Tabellen außer der Nachbildung von Säuren, von Milchsäure und der Abnahme der Laktose noch der Quotient aus Milchsäurebildung und der Gesamtsäure angeführt. Außerdem wurde der Quotient Milchsäurenachbildung und Laktoseabnahme berechnet.

Methodik.

Die Bestimmung des Säuregrades, der Milchsäure und der Laktose wurden in folgender Weise vorgenommen.

Der ganze Versuchsansatz wurde entsprechend 50 ccm Milch nach Zusatz einer 2%ig. Phenolphathaleinlösung mit n/4 Natronlauge bis zur Schwachrotfärbung titriert (Methode von Soxhlet und Henkel). Nach der Nomenklatur der Nahrungsmittelchemiker wurde als Säuregrad I ein Verbrauch von 1 ccm n/4 Natronlauge für 100 ccm Milch bezeichnet. Im allgemeinen verbrauchten 100 ccm Milch etwa 6,8 bis 7,5 ccm der n/4 Natronlauge (= Säuregrade). (Schwankungen 5,5 — 9,0) [7]. Nach Feststellung des Säuregrades wurde der Versuchsansatz in einen

[7]) Siehe Bujard-Baier, Hilfsbuch für Nahrungsmittelchemie, Berlin, Springer 1920.

200 ccm Meßkolben gespült und mit 20 ccm einer gesättigten Zinksulfatlösung versetzt. Sodann wurde das Zinksalz mit konzentrierter NaOH als Zinkhydroxyd niedergeschlagen bis zur schwachen Rotfärbung des Phenolphthaleins. Der geringe Ueberschuß an Lauge wurde mit einigen Tropfen Zinksulfatlösung wieder entfernt. Das Zinkhydroxyd fällt die Eiweißstoffe durch Adsorption aus. Nach Auffüllen bis zur Marke und häufigem kräftigem Umschütteln wurde der Niederschlag auf einer Porzellannutsche scharf abgesaugt und 50 ccm des Filtrats zur Bestimmung der Milchsäure und 15 ccm zur Bestimmung der Laktose benutzt. Die Laktosebestimmung wurde nach dem Verfahren von Soxhlet [8]) vorgenommen. Die Laktose reduziert hierbei Fehlingsche Lösung. Die Kupferwerte wurden nach Bertrand nach Auflösung des Cu_2O in Ferrisulfatschwefelsäure und Titration des gebildeten Ferrosalzes mit Permanganat ermittelt. Das Cu wurde nach der Tabelle von Soxhlet [9]) auf Laktose bezogen.

Die Milchsäurebestimmung erfolgte nach dem Verfahren von Fridemann, Contonio und Shaffer [10]), nachdem zuvor die Kohlenhydrate mittels Kupferkalkfällung entfernt wurden.

Versuch I.

Frische Milch wurde in der angegebenen Weise angesetzt und der Versuch nach 20 Stunden unterbrochen. Dabei war die Milch in der Kontrolle und bei Monobromacetatzusatz in den Verdünnungen von 10^{-7} bis $1 \cdot 10^{-5}$, also 1 : 100 000 geronnen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Die Tabelle zeigt, daß in der Verdünnung 10^{-4} die Säurenachbildung, die Milchsäurebildung und die Laktoseabnahme völlig unterdrückt ist, daß aber bereits in der Verdünnung 10^{-7} eine deutliche Hemmung aller drei Werte nachweisbar ist, die parallel mit steigenden Konzentrationen stärker wird. Praktisch kann man bereits die Verdünnung $1 \cdot 10^{-5}$ Monobromacetat als brauchbar annehmen, bei der bei einer Temperatur von annähernd 25 ° C, die Säurenachbildung auf ⅓, die Milchsäurebildung auf ¼ und die Laktoseabnahme auf $^1/_5$ des Kontrollverbrauchs heruntergedrückt sind. In der Gesamtacidität entsprechen 22,5 mg % Milchsäure 1 ccm der von uns verwandten n/4 Natronlauge. Im Kontrollversuch sind etwa 10 % der Acidität auf andere Säuren

---

[8]) Soxhlet: Bujard-Baier, S. 42.

[9]) derselbe: ebenda, S. 650.

[10]) Friedemann, Cotonio, Shaffer: J. of biol. Chem. 73, 335 u. 359. 1927.

Tabelle 1

Milch 20 Std.	Säuregrad n/4 NaOH	Milchsäure mg %	Laktose	Säurenachbildung	Milchsäurenachbildung mg %	Laktoseabnahme mg %	Säurenachbildung % vom Kontrollversuch	Milchsäurenachbildung % vom Kontrollversuch	Laktoseabnahme % vom Kontrollversuch	Qu. Milchsäure Gesamt Säure	Qu. Milchsäure Laktoseabnahme
direkt	7,8	22	5210	—	—	—	—	—	—	—	—
Kontrolle	32,4	516	4280	24,6	494	930	100	100	100	0,89	0,51
Monobromacetat											
$1{,}0.10^{-7}$	30,7	488	4410	22,9	466	800	93	94	86	0,90	0,55
$3{,}3.10^{-7}$	30,0	466	4510	22,2	444	700	90	90	75	0,89	0,60
$1{,}0.10^{-6}$	22,4	266	4740	14,6	244	470	59	49	51	0,74	0,49
$3{,}3.10^{-6}$	18,0	186	4960	10,2	164	250	41	33	27	0,72	0,63
$1{,}0.10^{-5}$	16,4	154	5010	8,6	132	200	35	26	21	0,68	0,63
$3{,}3.10^{-5}$	12,0	97	5120	4,2	75	100	17	15	11	0,79	0,71
$1{,}0.10^{-4}$	7,6	29	5190	-0,2	7	20	0	1	2	—	—
$3{,}3.10^{-4}$	7,6	27	5210	-0,2	5	0	0	1	0	—	—
$1{,}0.10^{-3}$	7,7	34	5210	-0,1	12	0	0	2	0	—	—

1.10^{-5} bis 1.10^{-3} nicht geronnen.

Tabelle 2

Milch 50 Std.	Säuregrad	Milchsäure mg %	Laktose mg %	Säurenachbildung	Milchsäurenachbildung	Laktoseabnahme	Säurenachbildung %	Milchsäurenachbildung %	Laktoseabnahme %	Qu. Milchsäure: Gesamtsäure	Qu. Milchsäure: Laktoseabnahme
direkt	8,0	41	4890	—	—	—	—	—	—	—	—
Kontrolle	35,85	554	4110	27,9	513	780	100	100	100	0,82	0,63
Monobromacetat											
$1{,}0.10^{-7}$	35,4	540	4140	27,4	499	750	99	97	96	0,81	0,63
$3{,}3.10^{-7}$	36,2	534	4120	28,2	493	770	101	96	99	0,71	0,61
$1{,}0.10^{-6}$	34,4	540	4090	26,4	499	800	95	97	102	0,84	0,59
$3{,}3.10^{-6}$	34,4	446	4160	26,4	405	730	95	89	94	0,68	0,53
$1{,}0.10^{-5}$	29,2	428	4290	21,2	382	600	76	76	77	0,81	0,61
$3{,}3\ 10^{-5}$	13,0	134	4740	5,0	93	150	18	18	19	0,83	0,59
$1{,}0.10^{-4}$	9,0	44	4760	1,0	3	130	4	6	17	0,13	0,023
$3{,}3.10^{-4}$	9,0	42	4860	1,0	1	30	4	2	4	0,04	0,03
$1{,}0.10^{-3}$	9,0	36	4860	1,0	−5	30	4	0	4	—	—

$3{,}3.10^{-5}$ bis 1.10^{-3} nicht geronnen.

Tabelle 3

Milch 48 Std.	Säure-grad	Milch-säure mg %	Laktose mg %	Säure-nach-bildung	Milch-säure nach-bildung	Laktose ab-nahme mg %	Säure-bildung %	Milch-säure-bildung %	Laktose ab-nahme %	Qu. Milchsäure	
										Gesamt säure	Laktose ab-nahme
direkt	7,6	20	4928	—	—	—	—	—	—	—	—
Kontrolle	38,1	720	4188	30,5	700	740	100	100	100	1,01	0,90
Monobromacetat											
$1{,}0.10^{-7}$	37,2	644	4292	29,6	624	636	97	89	86	0,94	0,94
$3{,}3\ 10^{-7}$	37,6	614	4276	30,0	594	652	99	85	88	0,87	0,87
$1{,}0.10^{-6}$	35,2	572	4232	27,6	552	696	91	79	93	0,76	0,76
$3{,}3.10^{-6}$	35,6	555	4264	28,0	535	664	92	76	90	0,77	0,77
$1{,}0.10^{-5}$	23,0	305	4566	15,4	285	362	51	41	53	0,75	0,75
$3{,}3.10^{-5}$	18,6	187	4716	11,0	167	212	36	24	29	0,75	0,75
$1{,}0.10^{-4}$	11,6	40	4868	4,0	20	60	13	3	8	0,32	0,32
$3{,}3.10^{-4}$	10,8	24	4896	3,2	4	32	10	0,6	4	0,12	0,12
$1{,}0.10^{-3}$	8,8	19	4928	1,2	—1	0	4	0	0	—	—

$3{,}3.10^{-5}$ bis 1.10^{-3} nicht geronnen.

(Fettsäuren ?) zu beziehen. Bei zunehmender Hemmung der Milchsäurebildung wird der Quotient Milchsäure zur Gesamtacidität immer kleiner. Aus 342 g Laktose entstehen 360 g Milchsäure. Der theoretische Quotient aus Milchsäure durch Laktoseabnahme wäre also 0,95. Im Kontrollversuch ist also nur die Hälfte etwa der abgebauten Laktose als Milchsäure wiedergefunden. Bei zunehmender Monobromacetatwirkung steigt die in Milchsäure umgewandelte Menge Laktose.

Versuch II und III.

In zwei weiteren Versuchen wurde unter gleichen sonstigen Bedingungen die Versuchsdauer auf zwei Tage verlängert, um zu prüfen, ob die Monobromacetatwirkung anhält. In dem zweiten und dritten Versuch ist von der Konzentration $3{,}3 \cdot 10^{-5}$ an die Milch ungeronnen geblieben. Dementsprechend sind auch die Werte für Säurebildung, Milchsäurebildung und Laktoseabnahme. Von dieser Verdünnung an sind die Werte gegen den direkten Versuch nur geringfügig verändert. Im übrigen gilt hierfür das bei Versuch I Gesagte.

Versuch IV.

In diesem Versuch wurde die Versuchsdauer noch weiter ausgedehnt und zwar die Ansätze aus dem gleichen Ausgangsmaterial nach 3, 5 und 7 Tagen untersucht. Um dabei die Säurewirkung und ihren hemmenden Einfluß auf die Milchsäurenachbildung zu unterdrücken, wurde in dieser Versuchsreihe Natriumbikarbonat (2 %) zugesetzt. Der Vergleich der Ansätze ohne Monobromacetat zeigt die starke Hemmung sowohl der Laktoseabnahme als auch der Milchsäurenachbildung in dem Versuch ohne Bikarbonatzusatz gegenüber dem als Kontrolle dienenden Ansatz mit Bikarbonat.

Nach drei Tagen war nur der Ansatz ohne Bikarbonat geronnen, nach 5 Tagen außerdem die Versuche mit Monobromacetat bis hinauf zur Konzentration $3{,}3 \cdot 10^{-6}$, nach sieben Tagen war nur bei der höchsten Monobromkonzentration von 10^{-3} die Milch ungeronnen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4, 5 und 6 zusammengestellt.

Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß nach drei Tagen noch bei $3{,}3 \cdot 10^{-5}$ Monobromacetat sowohl die Laktoseabnahme als

auch die Milchsäurebildung stark gehemmt ist, gegenüber dem direkten Versuch etwa um 85 %. Nach 5 Tagen ist die Hemmungswirkung nur noch in den beiden höchsten Konzentrationen von $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ und $1 \cdot 10^{-3}$ von annähernd gleicher Stärke. Während also die Versuche nach 1, 2, 3 Tagen annähernd gleich ausfallen, ist bei längerem Stehen nach 5 Tagen und besonders deutlich nach sieben Tagen eine Abnahme der Hemmungswirkung nachweisbar. Denn nach siebentägigem Stehen ist eine Hemmung der Milchsäurebildung und der Laktoseabnahme nur noch bei der höchsten Konzentration von Monobromacetat nachweisbar. Ob dabei die Monobromessigsäure irgendwie verändert wird oder ob vielleicht eine Gewöhnung der Bakterien in Betracht kommt, läßt sich nicht entscheiden.

Tabelle 4

Milch	Laktose: mg %			Milchsäure: mg		
	nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 7 Tagen	nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 7 Tagen
direkt	4650			11		
ohne $NaHCO_3$	3874	3330	3010	758	970	880
mit $NaHCO_3$ (Kontrolle)	2364	1920	1400	1950	1928	2200
Monobromacet.						
$1{,}0.10^{-7}$	2404	1950	1448	1960	1950	2240
$3{,}3.10^{-7}$	2270	1840	1342	2068	1960	2372
$1{,}0.10^{-6}$	2484	1964	1384	1770	1904	2184
$3{,}3.10^{-6}$	3000	2040	1424	1467	1690	2068
$1{,}0.10^{-5}$	3480	2068	1430	1068	1642	1920
$3{,}3.10^{-5}$	4340	2206	1492	316	880	1910
$1{,}0.10^{-4}$	4540	2360	1820	85	692	1798
$3{,}3.10^{-4}$	4630	3940	1865	38	368	1650
$1{,}0.10^{-3}$	4644	4400	2640	20	42	129

Tabelle 5

Milch	Laktoseabnahme: mg %			Milchsäurebildung: mg %		
	nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 7 Tagen	nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 7 Tagen
ohne $NaHCO_3$	876	1320	1640	747	959	869
Kontrolle	2286	2730	3250	1939	1917	2189
Monobromacet.						
$1{,}0.10^{-7}$	2256	2700	3202	1949	1939	2229
$3{,}3.10^{-7}$	2380	2810	3308	2057	1947	2361
$1{,}0.10^{-6}$	2166	2686	3266	1759	1893	2173
$3{,}3.10^{-6}$	1630	2610	3226	1451	1679	2057
$1{,}0.10^{-5}$	1170	2582	3220	1057	1631	1909
$3{,}3.10^{-5}$	310	2444	3158	305	869	1899
$1{,}0.10^{-4}$	110	2290	2830	74	681	1787
$3{,}3.10^{-4}$	20	710	2785	27	357	1639
$1{,}0.10^{-3}$	6	250	2010	9	31	118

Tabelle 6

Milch	Laktoseabnahme: % vom Kontrollversuch			Milchsäurebildung: % vom Kontrollversuch		
	nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 7 Tagen	nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 7 Tagen
Monobromacet.						
$1{,}0.10^{-7}$	99	99	99	100	101	102
$3{,}3.10^{-7}$	104	103	102	106	101	103
$1{,}0.10^{-6}$	95	98	99	90	99	99
$3{,}3.10^{-6}$	72	96	99	75	88	94
$1{,}0.10^{-5}$	51	95	99	54	85	87
$3{,}3.10^{-5}$	14	90	97	16	45	87
$1{,}0.10^{-4}$	5	84	87	4	35	82
$3{,}3.10^{-4}$	1	26	86	1,4	19	75
$1{,}0.10^{-3}$	0,3	9	62	0,5	1,6	5

Zusammenfassung.

Die Monobromessigsäurewirkung vermag das Sauerwerden und die Gerinnung der Milch schon in Konzentrationen von 1 : 100 000 an unter ungünstigsten Aufbewahrungsbedingungen für 1—3 Tage zu unterdrücken. Der Geschmack der Milch wird dadurch nicht verändert. Die Toxicität der Monobromessigsäure bei subkutaner Injektion beträgt nach Neuß [11]) etwa 50 mg pro 1 kg Kaninchen. Bei peroraler Darreichung führen größere Mengen von Monobromacetat durch freiwerdende Monobromessigsäure im Magen zu Verätzungen. Die in Betracht kommenden geringen Konzentrationen dürften kaum örtliche Schädigungen hervorrufen. Wieweit die Milch sonst durch den Monobromacetatzusatz hinsichtlich ihrer Fermentwirkung und ihrer Verdaulichkeit verändert wird, wurde nicht untersucht.

[11]) Neuss: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 160, 551, 1931.

Lebenslauf.

Ich, Bernhard Hakenkamp wurde am 25. Juli 1908 als Sohn des Landwirts Josef Hakenkamp und seiner Ehefrau Emma geb. op den Winkel in Lichtendorf bei Schwerte (Ruhr) geboren. Nach dreijährigem Besuch der Volksschule zu Lichtendorf besuchte ich das Realgymnasium zu Schwerte (Ruhr), wo ich Ostern 1926 die Reifeprüfung bestand. Ich widmete mich zunächst dem vet. med. Studium an der Hochschule Berlin. Ostern 1929 sattelte ich zur Medizin um. Herbst 1930 bestand ich das med. Physikum, nachdem ich 2 Semester des vet. med. Studiums angerechnet bekam und außerdem die naturwissenschaftlichen Fächer des med. vet. Physikums. Die klinischen Semester verbrachte ich in Münster, Greifswald, Münster. Das med. Staatsexamen bestand ich in Münster am 11. Juni 1934. Die mündliche Dr.-Prüfung war am 14. Dezember 1934.